

Brazilian Journal of Animal and Environmental Research

Transferabilidade de iniciadores de regiões microssatélites produzidos em veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*) para uso em estudos genéticos com cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*)

Transferability of microsatellite loci produced in gray brocket deer (*Mazama gouazoubira*) for use in genetic studies with brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*)

Recebimento dos originais: 06/06/2018

Aceitação para publicação: 21/08/2018

Lívia Perles

Graduada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp

Instituição: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp

Endereço: Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, 14884-900

E-mail: liviaperles@hotmail.com

Marina Gomes de Figueiredo

Doutora em Genética e Melhoramento Animal pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp

Instituição: Grupo de Agricultura Ecológica Kapi'xawa, UFES

Endereço: Alto Universitário, s/n. Caixa Postal 16 - Alegre - ES, 29500-000

E-mail: marinagfigueiredo@gmail.com

José Maurício Barbanti Duarte

Doutor em Ciências Biológicas pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp

Instituição: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp

Endereço: Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, 14884-900

E-mail: mauricio.barbanti@unesp.br

RESUMO

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), único representante do gênero *Blastocerus* é a maior espécie de cervídeo neotropical. A espécie é classificada pela lista vermelha da IUCN como vulnerável, especialmente pela perda de seu habitat, a várzea, para agropecuária e hidrelétricas. Com isso há grande frequência de isolamento populacional e consequentemente problemas com deriva e endogamia nas pequenas populações remanescentes. Os estudos genéticos podem contribuir de maneira decisiva no entendimento do efeito do isolamento populacional na sustentabilidade genética das populações. O presente estudo teve como objetivo testar iniciadores heterólogos desenvolvidos para a espécie *Mazama gouazoubira* em amostras de cervos-do-pantanal de uma população reintroduzida e com baixo nível de diversidade genética. O DNA de 8 animais reintroduzidos foi amplificado por meio de iniciadores e enviados para genotipagem. Sete dos 16 iniciadores heterólogos selecionados, amplificaram a região microssatélite esperada, sendo somente dois deles polimórficos, confirmando a baixa diversidade genética desta população. A partir dos resultados obtidos, o estudo permitiu identificar iniciadores heterólogos produzidos para *Mazama gouazoubira*

capazes de amplificar a mesma região microssatélite para os cervídeos da espécie *Blastocerus dichotomus*.

Palavras-chave: Estudos moleculares; Conservação; Cervidae.

ABSTRACT

The marsh deer (*Blastocerus dichotomus*), the only representative of the genus *Blastocerus* is the largest species of neotropical deer. The species is classified by the IUCN red list as vulnerable, especially by the loss of their habitat, the várzea, for agriculture and hydroelectric plants. With this, there is a high frequency of population isolation and consequently problems with drift and inbreeding in the small remaining populations. Genetic studies can contribute decisively to the understanding of the effect of population isolation on the genetic sustainability of populations. The present study had as objective to test heterologous primers developed for the species *Mazama gouazoubira* in samples of Pantanal deer of a population reintroduced and with low level of genetic diversity. DNA from 8 reintroduced animals was amplified by primers and sent for genotyping. Seven of the 16 selected heterologous primers amplified the expected microsatellite region, two of which were polymorphic, confirming the low genetic diversity of this population. From the results obtained, the study allowed to identify heterologous primers produced for *Mazama gouazoubira* able to amplify the same microsatellite region for the deer of the species *Blastocerus dichotomus*.

Keywords: Molecular analyses; Conservation; Cervidae.

1 INTRODUÇÃO

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), único representante do gênero *Blastocerus* é a maior espécie de cervídeo brasileiro, atingindo, quando adulto, uma altura média na cernelha de 1,3 m e um peso de 100 kg para fêmeas e 130 kg para machos (Duarte 1996). São animais de comportamento solitário, porém já foram observados grupos compostos por um adulto e um ou mais jovens (Pinder & Grosse, 1991; Tomas et al., 1997; Piovezan et al. 2010). A distribuição histórica da espécie no Brasil abrangia desde o sul da floresta Amazônica até o sul e sudeste do estado do Rio Grande do Sul (Ribeiro 1919).

Atualmente sua distribuição encontra-se bastante reduzida, sendo a sua maioria composta de populações residuais encontradas no Pantanal brasileiro (Estado de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), na região da Ilha do Bananal, Rio Araguaia (Estado de Mato Grosso e Tocantins), no Rio Guaporé (Estado de Rondônia) e nas várzeas remanescentes do Rio Paraná (Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo) (Pinder & Seal 1995; Tomás et al., 1997; Piovezan et al. 2010, Duarte & Reis 2012). Recentemente a drenagem de várzeas para construção de usinas hidrelétricas tem-se tornado uma grande ameaça à espécie. A última população significativa de cervo-do-pantanal no estado de São Paulo ocupava as várzeas do Rio Paraná entre as barragens de Jupia e Porto Primavera (Schaller & Vasconcelos 1978). A construção da Usina Hidrelétrica de Porto Primavera, numa área constituída

praticamente de várzea, teve impacto direto nos cervos-do-pantanal ali existentes (Piovezan et al., 2001, Andriolo et al. 2013).

Com o intuito de obter informações sobre a população de Porto Primavera, na ocasião da conclusão das obras da Usina Hidrelétrica Engenheiro Sérgio Motta (Porto Primavera - UHPP) foi implementado o Projeto Cervo-do-Pantanal de Porto Primavera. A proposta do projeto era obter conhecimento sobre genética, reprodução, ecologia, captura, contenção, enfermidades parasitárias e infecciosas, além de avaliar o efeito do enchimento do reservatório sobre a população de cervos-do-pantanal.

O projeto também visou à criação de um programa de conservação de animais em cativeiro e implantação do Projeto de Reintrodução do cervo-do-pantanal (Duarte 2001). A reintrodução visa retornar espécies a locais onde já existiram e encontram-se extintas, envolvendo libertação de animais cativos, quer sejam nascidos no cativeiro ou capturados em vida livre (Armstrong & Seddon, 2007). Foram selecionadas duas áreas para o desenvolvimento do projeto: a Fazenda Continental, localizada no município de Colômbia ao Norte do Estado de São Paulo e a Estação Ecológica de Jataí (EEJ), município de Luís Antônio a Nordeste do Estado de São Paulo. Os animais introduzidos na Fazenda Continental vieram a óbito em período de trinta dias, não possibilitando a obtenção de dados (Figueira et al. 2005). Na EEJ foram reintroduzidos cinco animais em dezembro de 1998, grupo composto por dois machos e três fêmeas resgatados da área da Usina Hidroelétrica de Porto Primavera. Esses animais foram monitorados através da utilização de radio-colares no período de dezembro de 1998 a abril de 2000.

Uma segunda reintrodução, de um macho e duas fêmeas, ocorreu em agosto 2001. Foram realizadas capturas em julho de 2004, novembro de 2006 e junho de 2007 para coleta de material biológico e colocação de brincos transmissores, num total de 23 animais. Pesquisas realizadas na população de cervos-do-pantanal da EEJ indicaram que apenas sete dos oito animais introduzidos realmente fundaram a população (Soares 2012). Devido ao pequeno número de indivíduos fundadores da nova população, vários problemas genéticos podem estar ocorrendo, dentre eles o efeito fundador (Moran 2008 Frankham et al., 2002) e a endogamia, que potencialmente poderia levar à depressão endogâmica (Breda et al., 2004).

Ainda a permanência de um pequeno número de animais na população implicaria num efeito importante da deriva genética, já que a população tem pouca capacidade de exceder 25 indivíduos, devido ao reduzido tamanho da área (Peres et al. 2018). Dados obtidos por Soares (2012) a partir de marcadores moleculares denotam ampla perda de diversidade genética tanto por efeito fundador (de 4,5 alelos/loco na população fonte para 3,5 alelos por loco na população fundadora), como por deriva genética (3 alelos/loco em F1, 2,8 alelos/loco em F2 e 2 alelos/loco em F3). Assim, os marcadores

moleculares são muito utilizados na genética da conservação, tornando possível o estudo de populações ameaçadas em condições naturais (Frankham et al., 2004).

O desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para cada espécie é um dos grandes problemas da utilização destes marcadores, devido à alta demanda de trabalho e altos gastos laboratoriais. Porém, tem sido observado que devido à conservação de sítios de hibridação de iniciadores para locos de microsatélite em espécies relacionadas é possível aproveitar iniciadores já descritos para outras espécies, diminuindo assim as dificuldades para seu uso (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Zane et al., 2002).

A conservação de sítios de hibridização entre espécies próximas de cervídeos já foi detectada (Mantelatto et al. 2010). Os marcadores microsatélites permitem identificação individual dos animais e pode ser analisado a partir de estudos não invasivos, com o uso das fezes como fonte de DNA (Oliveira & Duarte 2013). Marcadores microsatélites já foram utilizados em cervos-do-pantanal, tanto os heterólogos (Leite et al. 2007) como construídos na própria espécie (Oliveira et al. 2009), entretanto poucos deles são funcionais e polimórficos. Assim, frente à necessidade de monitoramento molecular em populações relictuais e isoladas de cervos-do-pantanal é necessária a padronização de um maior número de iniciadores para regiões microsatélites.

O presente trabalho tem como objetivo o relato do uso de iniciadores heterólogos desenvolvidos para a espécie *Mazama gouazoubira*, utilizados em uma população de *Blastocerus dichotomus* com baixa diversidade genética.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O DNA de uma amostra de músculo obtida de um animal da população de cervos-do-pantanal da EEJ abatido por caçadores foi extraído através do protocolo fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 1989). Após a extração do DNA, 15 iniciadores desenvolvidos para *M. gouazoubira* foram testados (tabela 1). Com relação à composição das reações de PCR, estas foram padronizadas para um volume final de 20 µL contendo 2,6 µL de tampão Taq (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂), 1,3 µL de dNTP, 0,6 µL de cada iniciador (0,16 mM), 7,3 µL de água ultrapura, 2,6 µL de Taq polimerase.

Tabela 1 - Nome e sequência de iniciadores descritos para *Mazama gouazoubira*.

Nome	FW-PRIMER	RV-PRIMER
Goua6	CTGTGATGATAAATGCCTGGAG	TGAAAGTAAATCTCTGGGTCCTG
Goua7	GTCTGATCCAAATCTGAGGGTC	TCATAGCATCCAAGGCAAACATA
Goua8	AAAGGAGATGTCAGGATATGGG	ACTTGGTTGATTTCGCTGCTAT
Goua9	TCAGAGTGAGATAAAGCTGAGGC	GTTGAATATGACTGAGCGACTG
		A
Goua10	TAGTGGGACGTTTGTGTTGTT	TGGATCTTTGGAGAGGGTCTAA
Goua11	GCCATAACCAACGAAAGGATAC	CCTTGTTGAGGAGTGGAGGTAG
Goua12	TCTGAGCCCTAGTTCAGCAGAC	CAAGAAACACACACATTCCCAG
Goua13	GAAGCCGATTTGACCTCATCT	TTATTCCCCTGAGCATTGTCTT
Goua14	GGAGTATTCTGTCTTTGGCGAT	TTTCATCCATACCTCAGCACTC
Goua15	GTCTGGTAGCCGCCATAAAG	CTCACCACCTCCACCATCAC
Goua16	GGGACAGTGATAAACTAGGTGT	CTAATGAGATAGCAAAGTACGC
Goua17	GCAATCCCTATCAAGCTACCAA	TGATTCCTCCAGTTCCATTCTT
Goua20	ACAACCTGGAGAAAACCTTGTG	AGCCTTTAGAGATGTTCTGTTTG
		G
Goua21	GAGTACAACAGCCATGCAGAGA	CATTGGGGTTCACCTAGAGAAG
Goua22	GATTCAGTTTTTGGGGAGAA	ATTCACAGCAGAGATTTACCAC

Em relação à condição de termociclagem, todos os iniciadores seguiram um mesmo protocolo de temperaturas, variando somente a temperatura de ligação dos oligonucleotídeos iniciadores (35 ciclos das seguintes temperaturas: 94°C por 30 segundos, temperatura de ligação 50-55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, extensão final por 10 minutos a 72°C). Foi verificada a eficiência da reação de PCR através de eletroforese em gel de agarose 1%. Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados em sequenciador automático 3730XL Applied Biosystems pertencente ao centro de sequenciamento BCC, localizado no Campus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para avaliação da presença das regiões microssatélites.

Para avaliar a população de cervo-do-pantanal da EEJ, foi realizada a extração de DNA das amostras de pelo dos sete animais fundadores dessa população. A extração de DNA das amostras foi realizada de acordo com o protocolo de Sambrook et al. (1989), com adaptações. O produto da extração foi amplificado com os primers que demonstraram possuir a região microssatélite com as seguintes condições de termociclagem: (35 ciclos das seguintes temperaturas: 94°C por 30 segundos, temperatura de ligação 50-55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, extensão final por 10 minutos

a 72°C). As genotipagens foram realizadas no sequenciador ABI xl 3730 da Applied Biosystems. Todas as amostras foram enviadas em duplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, o estudo permitiu identificar iniciadores heterólogos produzidos para *M. gouazoubira* capazes de amplificar a mesma região microssatélite para a espécie *B. dichotomus*. Sete dos 15 iniciadores heterólogos selecionados, amplificaram a região microssatélite esperada (Goua3, Goua7, Goua8, Goua9, Goua10, Goua11, Goua16). O número total de alelos encontrados na população reintroduzida foi de 9, com uma média de 1,2 alelos por loco (tabela 2).

Tabela 2– Resultado da genotipagem dos indivíduos fundadores da população de cervos-do-pantanal reintroduzida na Estação Ecológica do Jataí.

Indivíduo	Goua3	Goua7	Goua8	Goua9	Goua10	Goua11	Goua16
82	109	134	145	184	106	193	188
100	109	134	145	184	106	193	188
111	109	134	145	184	106	193	188
129	109	128	145	184	106	193	188
202	109	134	145	184	106	168/193	188
215	109	134	145	184	106	193	188
216	??	134	??	184	106	193	188

Foi encontrado apenas um alelo para os primers Goua3, Goua8, Goua9, Goua10, Goua16. Os primers Goua7 e Goua11 resultaram em somente um indivíduo com alelo diferente, o que confirmou a baixa diversidade genética desta população. Outros estudos anteriores com cervos-do-pantanal também demonstraram que essa espécie possui uma baixa variabilidade genética (Marques et al. 2006; Leite et al. 2007, Oliveira et al. 2009). Um estudo com 147 indivíduos de três populações de cervos-do-pantanal do rio Paraná, utilizando isoenzimas como marcador, encontrou em 17 locos analisados, polimorfismo em apenas 6 locos, sendo que o mais polimórfico apresentou apenas 4 alelos (Oliveira et al. ,2005). Outro motivo que justificaria o baixo polimorfismo encontrado nestes indivíduos seria o fato de que os iniciadores utilizados não foram desenvolvidos para *B. dichotomus* e sim para uma

espécie filogeneticamente próxima, *M. gouazoubira*, que pode levar a ocorrência de alelos nulos ou até falsos (Foucault et al, 1996; Taberlet et al, 1996).

Os altos custos dos programas de reintrodução e a limitação de espaço de áreas propícias impedem que grande número de indivíduos sejam reintroduzidos e mantidos nas áreas de escolha, o que pode predispor a população a problemas genéticos como efeito fundador, deriva genética e endogamia, que levariam à perda de diversidade genética e depressão endogâmica. Portanto, o ideal seriam estudos genéticos constantes da população reintroduzida. Assim, quando detectados tais problemas, medidas de manejo populacional poderiam ser tomadas para a diminuição desses efeitos na população (Soares 2011). Para que as populações relictuais e reintroduzidas possam ser geneticamente monitoradas, novos marcadores devem ser buscados, permitindo a avaliação de estruturação genética, perda de diversidade e níveis de endogamia, contribuindo com suas estratégias de manejo e conservação.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que os oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos para *Mazama gouazoubira* foram capazes de amplificar a mesma região microssatélite da espécie *Blastocerus dichotomus*, sendo possível a utilização desses marcadores para estudos genéticos de populações ameaçadas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo: [2013/17257-4](#)) e CNPq pelas bolsas concedidas e à CESP, ao CFDD do Ministério da Justiça do Brasil e ao Tropical Forest Conservation Act/Funbio pelo apoio financeiro desde o início do projeto de reintrodução dos cervos-do-pantanal na Estação Ecológica do Jataí.

REFERÊNCIAS

- Andriolo A, Piovezan U, Costa MJRP, Torres HA, Vogliotti A, Zerbini AN, Duarte JMB (2013) Severe population decline of marsh deer, *Blastocerus dichotomus* (Cetartiodactyla: Cervidae), a threatened species, caused by flooding related to a hydroelectric power plant. **Zoologia**, 30:630–638.
- Armstrong DP, Seddon PJ (2007) Directions in reintroduction biology. **Trends in Ecology and Evolution**, 23:20-5.
- Breda FC, Euclides RC, Pereira CS, Torres RA, Carneiro PLS, Sarmiento JLR, Filho R AT, Moita AKF (2004) Endogamia e Limite de Seleção em Populações Seleccionadas Obtidas por Simulação. **Revista Brasileira Zootecnia**, 33:2017-2025.

- Duarte JMB (1996) Guia de identificação de cervídeos brasileiros. 1.ed. Jaboticabal: FUNEP, p. 14.
- Duarte JMB (2001) O Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de Porto Primavera: Resultado de dois anos de pesquisa. CD ROM. FUNEP. Jaboticabal, São Paulo.
- Duarte JMB, Reis ML (2012) Plano de ação nacional para a conservação dos cervídeos ameaçados de extinção. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Icmbio.
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1996) Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 220p.
- FIGUEIRA CJM, PIRES JSR, ANDRIOLO A, COSTA MJRP, DUARTE JMB (2005) Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) reintroduction in the Jataí ecological station (luís antônio, sp): spatial preferences. **Brazilian Journal of Biology** 2(65): 263-270.
- Fitzsimmons NN, Moritz C, Moore SS (1995). Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. **Molecular Biology and Evolution**, 12:432-440.
- FRANCISCO FO, BRITO RM, ARIAS MC (2006) Allele number and heterozygosity for microsatellite loci in different stingless bee species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Neotropical Entomology**, 35:638-643.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge: Cambridge University Press, 617.
- Foucault F, Praz F, Jaulin *Cet al.* (1996) Experimental limits of PCR analysis of (CA)_n repeat alterations. **Trends in Genetics**, 7: 450–452.
- Leite KCE, Collevatti RG, Menegasso TR, Toms WM, Duarte JMB (2007) Transferability of microsatellite loci from Cervidae species to the endangered Brazilian marsh deer, *Blastocerus dichotomus*. **Genetics and Molecular Research**, 6(2):325-330.
- LOPES DN, CAMPOS LAO, FERNANDES SALOMAO TM, TAVARES MG (2010) Comparative study on the use of specific and heterologous microsatellite primers in the stingless bees *Meliponarusufiventris* and *M. mondury* (Hymenoptera, Apidae). **Genetics and Molecular Biology**, 33(2)390- 393.
- Mantellatto AM, Carnelossi EA, Duarte JM (2010) Transferability of microsatellite loci from exotic Cervidae to Brazilian brocket deer (*Mazama* spp, Mammalia: Cervidae). **Genetics and Molecular Research**, 9 (1): 277-282
- Marques A, Maldonado JE, Gonzalez S, Beccaceci MD, Garcia JE, Duarte JMB (2006) Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from the Río de la Plata Basin. **Conservation Genetics**, 7: 563-575, 2006.

Morin PA, Woodruff DS (1992) Paternity exclusion using multiple hypervariable microsatellite loci amplified from nuclear DNA of hair cells. **Karger**, 63-81.

Oliveira EJF, Garcia JE, Duarte JMB, Contel EPB (2009) Development and characterization of microsatellite loci in the marsh deer (*Blastocerus dichotomus* Cervidae). **Conservation Genetics**, 10:1505-1506.

Oliveira ML, Duarte JMB (2013) Amplifiability of mitochondrial, microsatellite and amelogenin DNA loci from fecal samples of red brocket deer *Mazama americana* (Cetartiodactyla, Cervidae). **Genetics and Molecular Research**, 12(1):44-52, 2013.

Pinder L, Grosse AP (1991) *Blastocerus dichotomus*. **Mammalian Species**, 380: 1-4.

Pinder L, Seal US (1995) Population and habitat Viability Assessment Report for Marsh deer *Blastocerus dichotomus* (PHVA). IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, MN, USA.

Piovezan U, Jacob AA, Andriolo A, Paranhos da Costa MJR, Duarte JMB (2001) Estudo preliminar dos efeitos da inundação provocada pela UHE Sérgio Motta (Porto Primavera) na sobrevivência e na definição de áreas de moradia do Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) nas proximidades da foz do rio do Peixe, Estado de São Paulo, Brasil. Cd- Rom, FUNEP, Jaboticabal.

Piovezan U, Tiepolo LM, Tomas WM, Duarte JMB, Varela D, Marinho-Filho JS (2010) Marsh deer *Blastocerus dichotomus* (Illiger 1815). In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLES, S. (Eds.). **Neotropical Cervidology – Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: FUNEP, IUCN, 8:66-76.

Ribeiro A (1919) Veados do Brasil segundo as coleções Rondon e de vários museus nacionais e estrangeiros. *Revista do Museu Paulista*, 11: 213-308.

Schaller GB, Vasconcelos JM (1978) A marsh deer census in Brazil. **Oryx**, 14:345-351.

Soares PR (2012) Genética da reintrodução: o caso do cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) na Estação Ecológica de Jataí. Tese de mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/92542>

Taberlet, P., Griffn, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L. P. & Bouvet, J. 1996 Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. **Nucleic Acids Research**, 24:3189-3194

Tomas WM, Beccaceci MD, Pinder L (1997) Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*). In: Duarte, J.M.B. (Ed.) *Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotocerus e Mazama*. Jaboticabal. FUNEP, 24-40.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, 11(1):1-16.